



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61L 31/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/42391 (43) Date de publication internationale: 1er octobre 1998 (01.10.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00595</p> <p>(22) Date de dépôt international: 25 mars 1998 (25.03.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/03672 26 mars 1997 (26.03.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PEULVE, Pascal [FR/FR]; 839, rue des Longs Vallons, F-76960 Notre Dame de Bondeville (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; 5, rue Joseph Grancier, F-75007 Paris (FR). TADIE, Marc [FR/FR]; 15, rue de Plélo, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LANCELOT, Géraldine; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR STIMULATING NEURAL REGENERATION</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE STIMULATION DE LA REGENERATION NERVEUSE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to methods used to stimulate neural regeneration, and can be applied to peripheral nerves as well as the nerves of the central nervous system, especially of the spinal cord. The invention notably employs a system comprising a biocompatible sleeve, into which a system of expression of a neurotrophic factor is inserted.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des méthodes de stimulation de la régénération nerveuse, applicables aussi bien sur les nerfs périphériques que dans le système central, et en particulier la moelle épinière. L'invention fait appel en particulier à un système de manchon biocompatible dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE STIMULATION DE LA REGENERATION NERVEUSE

La présente invention concerne le domaine de la biologie, et en particulier de la biologie médicale du système nerveux. Elle concerne plus particulièrement des méthodes de stimulation de la régénération nerveuse, applicables aussi bien sur les nerfs périphériques que dans le système central, et en particulier la moelle épinière. De part leur caractère local et spécifique, les méthodes de l'invention peuvent être utilisées pour stimuler la régénération nerveuse dans différentes situations pathologiques, et en particulier dans des cas de lésions de la moelle épinière, de nerfs périphériques, du plexus brachial ou lombaire.

Les lésions du système nerveux aussi bien central (SNC) que périphérique (SNP) sont fréquentes en traumatologie et dramatiques. Ainsi, les lésions médullaires, qu'elles soient d'origine traumatique ou dégénérative, les lésions de nerfs périphériques, les lésions de plexus brachial ou lombaire, laissent à ce jour les blessés ou malades lourdement handicapés à vie. Bien que le SNP possède une forte capacité à régénérer spontanément, l'utilisation de techniques classiques de réparation des nerfs ne donne que des résultats décevants. Ces techniques sont principalement composées par l'anastomose directe ou la pose d'un greffon nerveux autologue ou hétérologue lorsque les tensions sont trop importantes pour permettre la suture des deux extrémités nerveuses (en cas de perte de substance, ou de lacération excessive du nerf demandant la résection d'un segment nerveux). Avec ces techniques, moins de 5% des patients ayant reçu une réparation du nerf médian au niveau du poignet retrouvent une sensation ou une motricité normale après 5 ans (1).

Plus récemment, l'utilisation de prothèses tubulaires joignant les extrémités d'un nerf lésé (technique de manchonnage) a offert une alternative à ces techniques classiques de réparation des nerfs (2,3). Cette technique offre l'avantage de simplifier les conditions de réalignement des faisceaux

nerveux, et a permis de ponter avec succès, à la fois expérimentalement mais aussi cliniquement, des petites pertes de substance (jusqu'à 5-7 mm (1-6)). Cependant, il apparait que pour ponter des pertes de substance d'une taille supérieure l'adjonction de substances neurotrophiques ou de cellules à l'intérieur des tubes est indispensable. Expérimentalement, plusieurs facteurs tels les FGF-1 et -2, ou le NGF en application in vivo dans le tuteur (7-10), ou encore le CNTF ou l'IGF II en application systémique ont été testés, sans pour autant démontrer clairement leur rôle sur la régénération nerveuse (7-12). Par ailleurs, il n'existe actuellement aucun traitement clinique des lésions de la moelle épinière.

La présente invention apporte une solution à ce problème du traitement des lésions nerveuses, traumatiques ou dégénératives. La présente invention concerne en effet un méthode de stimulation de la régénération nerveuse au moyen d'un manchon biocompatible et d'une composition d'acides nucléique codant pour des facteurs neurotrophiques. La présente invention concerne également un dispositif pour stimuler la régénération nerveuse comprenant un manchon biocompatible dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur de stimulation de la croissance nerveuse (facteur neurotrophique). Un autre aspect de l'invention est relatif à un kit pour la stimulation de la régénération nerveuse comprenant d'une part un manchon biocompatible et d'autre part une composition comprenant un système d'expression d'un facteur de stimulation de la croissance nerveuse. La présente invention concerne également l'utilisation, pour la préparation d'une composition destinée à stimuler la régénération nerveuse, d'un manchon biocompatible dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.

La présente invention est en outre applicable aussi bien à la régénération des nerfs périphériques que pour stimuler la régénération axonale dans la moelle épinière.

La présente invention découle de plusieurs observations. Elle découle en particulier de la mise en évidence qu'il est possible de rétablir chirurgicalement entre deux sections d'un nerf un pont physique au moyen d'un dispositif approprié, et d'introduire dans ce dispositif un système d'expression d'un facteur neurotrophique. Elle découle également de la mise en évidence qu'il est possible d'induire une concentration locale de facteurs trophiques, pendant une durée suffisante pour stimuler la croissance neuronale. La présente invention combine ainsi plusieurs propriétés particulièrement avantageuses sur le plan thérapeutique. Elle permet tout d'abord une action durable, grâce à un effet de libération prolongé du facteur trophique. L'effet biologique du facteur neurotrophique est de plus potentialisé par l'effet tuteur du manchon, qui permet d'accélérer et de guider la croissance neuronale. La méthode de l'invention permet également une action très locale et donc très spécifique, les facteurs trophiques étant cloisonnés dans un dispositif étanche, sur le site du traumatisme ou de la dégénérescence. Les résultats présentés dans les exemples montrent à cet effet que la méthode de l'invention permet une réparation de nerfs rapide, efficace et locale.

La méthode de l'invention consiste plus particulièrement à intervenir localement au niveau d'une section nerveuse. La section proximale ou distale du nerf ou faisceau sectionné est introduite à une extrémité d'un manchon biocompatible, où elle est maintenue physiquement en place. Une composition comprenant un système d'expression d'un facteur neurotrophique est ensuite introduite dans ledit manchon. La deuxième section du nerf ou faisceau sectionné est alors introduite à l'autre extrémité du manchon, où elle est également maintenue en place physiquement. Pour éviter une diffusion du système d'expression hors du manchon, celui-ci est avantageusement ligaturé et/ou maintenu par une colle biologique au niveau des extrémités. Ce dispositif peut en outre permettre de nouvelles injections de systèmes d'expression. La présence à la fois du support et du facteur

neurotrophique en concentration élevée et pour une durée prolongée permet, comme illustré dans les exemples, de reconstituer une continuité nerveuse et ainsi, de restituer l'activité correspondante.

- De manière plus spécifique au système nerveux périphérique, la méthode de l'invention consiste à prendre un nerf périphérique ou une racine sous jacente à la lésion et à mettre en place un manchon biocompatible après résection d'une partie du nerf ou de la racine. La partie proximale de la section, qu'elle soit motrice ou sensitive, est introduite dans le manchon et maintenue en place, par exemple par suture ou par pose de colle biologique.
- 10 Le système d'expression codant pour le facteur actif est injecté dans ce manchon, qui est laissé en place. La partie distale de la section est alors rebranchée à l'autre extrémité du manchon permettant la restitution d'une continuité axonale (Figure 1).

- Au niveau du système nerveux central, et en particulier médullaire, la méthode de l'invention est également particulièrement adaptée pour ponter les lésions de la moelle épinière. Ce type de traumatisme constitue d'ailleurs l'une des applications principales du système de l'invention, et pour lesquelles aucun traitement clinique n'existe à ce jour. Deux types d'applications peuvent être envisagés : soit le pontage des afférences périphériques sous-jacentes à une lésion à la moelle saine sus-jacente à cette lésion (Fig.5), soit le pontage de la moelle saine sus-jacente à une lésion, à la moelle sous jacente à cette lésion (Fig 6).
- 15 20

- Dans le premier cas, une ou plusieurs racines sous-jacentes à une lésion médullaire (Fig.5A) sont sectionnées. introduites dans une prothèse tubulaire (manchon) et maintenues en place à l'aide de sutures et de colle biologique.
- 25 Le tuteur peut alors recevoir des systèmes d'expression portant des gènes susceptibles de stimuler l'élongation axonale des motoneurones; et/ou éventuellement différents facteurs connus pour stimuler la repousse axonale tel un greffon nerveux périphérique, ou des cellules. Le tuteur est alors

introduit dans une incision longitudinale réalisée dans la moelle saine sus-jacente à la lésion de manière à ce que l'extrémité proximale du tube affleure la corne antérieure de la substance grise (lieu de localisation des motoneurones spinaux). Le tuteur est fixé par une ou plusieurs sutures à l'arachnoïde et de la colle biologique (Fig.5B). Un tel montage peut ainsi redonner une fonctionnalité à certains muscles vitaux.

Dans le second cas la partie lésée de la moelle est excisée et un tuteur est implanté en amont et en aval de manière à joindre les principaux faisceaux (pyramidal, corticospinal etc..) entre les parties sus- et sous-lésionnelles (Figure 6). Le tuteur est ensuite rempli des mêmes substances que précédemment.

Dans le cadre de l'invention, on entend par partie proximale de la section, ou partie proximale du nerf, la partie du nerf qui est en contact avec le système nerveux central. S'agissant d'un nerf périphérique, sa partie proximale est celle connectée à la moelle épinière. S'agissant d'une lésion de la moelle épinière, la partie proximale est celle qui est en contact avec le système nerveux central.

On entend également par partie distale de la section, ou partie distale du nerf, la partie périphérique du nerf. S'agissant d'un nerf périphérique, sa partie distale est donc celle connectée à la plaque motrice (jonction neuromusculaire). S'agissant d'une lésion de la moelle épinière, la partie distale est celle qui se trouve déconnectée du système nerveux central.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, le manchon peut être constitué de tout dispositif compatible avec une utilisation thérapeutique. La structure et la composition du manchon sont avantageusement définies de sorte que (i) il restitue une continuité axonale, (ii) il puisse contenir une composition comprenant un système d'expression de facteurs actifs, (iii) il puisse servir de tuteur à la repousse axonale, aussi bien de la moelle épinière vers la périphérie, de la périphérie vers la moelle épinière, que de la moelle épinière

vers la moelle épinière. La propriété de tuteur du manchon s'exerce par la faculté des nerfs d'adhérer et de pousser sur celui-ci, en particulier sur sa face interne. L'adhérence peut résulter de toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la
5 fixation des cellules sur le manchon. Par ailleurs, pour des applications en thérapie humaine, il est également souhaitable que le manchon soit de type imperméable ou semi-perméable, mais ne permettant pas la passage du système d'expression.

Avantageusement, le manchon est un support solide, non toxique et
10 biocompatible. Il peut s'agir en particulier d'un manchon constitué matériau(x) synthétique(s), tels que silicone, PAN/PVC, PVFD, des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou encore des copolymères acryliques. Dans un mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, on préfère utiliser un manchon constitué ou à base de biomatériaux, tel que notamment le
15 collagène réticulé, la poudre d'os, les polymères à base d'hydrates de carbone, les dérivés d'acide polyglycolique/polylactique, les esters d'acide hyaluronique, ou les supports à base de calcaire. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène ou du silicone. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus
20 préférentiellement, on utilise un manchon constitué d'une bicouche de collagène de type I ou III ou IV, avantageusement IV/IVox, ou de silicone. On peut citer à titre d'exemple précis un manchon Silastic (Dow-Corning), constitué de silicone. Par ailleurs, le manchon possède avantageusement une forme tubulaire, de section cylindrique ou angulaire. Le diamètre du
25 manchon peut être adapté par l'homme du métier en fonction des applications recherchées. En particulier, s'agissant de stimuler la régénération d'un nerf périphérique, un diamètre relativement petit peut être utilisé, de 0,05 à 15 mm. Plus préférentiellement, le diamètre intérieur du manchon est compris entre 0,5 et 10 mm. Pour des application de
30 régénération de la moelle épinière, des manchons de diamètre intérieur plus

- important peuvent être choisis. En particulier, pour ces applications, les manchons utilisés ont un diamètre interne pouvant atteindre 15 à 20 mm, selon la section nerveuse concernée. Pour le pontage d'une racine avulsée au niveau du plexus brachial, le diamètre du manchon correspond
- 5 avantageusement au diamètre de la racine. La longueur du manchon est généralement déterminée par la taille de la perte de substance à compenser. Des manchons d'une longueur comprise entre 0,5 et 5 cm peuvent être utilisés. De manière préférentielle, la longueur du manchon reste inférieure à 5 cm, des pertes de substance supérieures à 5 cm étant moins fréquentes.
- 10 Comme indiqué ci-avant, la méthode de l'invention consiste, dans un premier temps, à introduire une première partie du nerf dans le manchon. Il s'agit avantageusement de la partie proximale du nerf. Celle ci est ensuite maintenue en place pour assurer (i) une bonne pousse nerveuse et (ii) une
- 15 étanchéité du dispositif. Pour ce faire, il est possible d'effectuer une suture entre le nerf et le manchon et/ou de poser une colle biologique. La suture peut être réalisée selon les méthodes classiques de chirurgie, en utilisant du fil approprié. La colle biologique peut être toute colle biocompatible, applicable au système nerveux. Il peut s'agir notamment de toute colle biologique utilisée en chirurgie humaine, et en particulier une colle
- 20 constituée de fibrine : Biocolle (Biotransfusion, CRTS, Lille), Tissucol (Immuno AG, Vienne, Autriche), etc.

Le procédé de l'invention comprend, comme indiqué ci-avant, l'introduction, dans le manchon, d'une composition comprenant un système d'expression de facteurs neurotrophiques.

- 25 Au sens de l'invention, le terme "système d'expression" désigne toute construction permettant l'expression in vivo d'un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique. Avantageusement, le système d'expression comprend un acide nucléique codant pour un facteur neurotrophique sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel (cassette d'expression). Cet acide

nucléique peut être un ADN ou un ARN. S'agissant d'un ADN, on peut utiliser un ADNc, un ADNg ou un ADN hybride, c'est-à-dire un ADN contenant un ou plusieurs introns de l'ADNg, mais pas tous. L'ADN peut également être synthétique ou semi-synthétique, et en particulier un ADN synthétisé artificiellement pour optimiser les codons ou créer des formes réduites.

Le promoteur transcriptionnel peut être tout promoteur fonctionnel dans une cellule mammifère, de préférence humaine, et notamment nerveuse. Il peut s'agir de la région promotrice naturellement responsable de l'expression du facteur neurotrophique considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule ou l'organisme concernés. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de régions promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de régions promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoA1, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

On utilise avantageusement dans le cadre de l'invention un promoteur constitutif eucaryote ou viral. Il s'agit plus particulièrement d'un promoteur choisi parmi le promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline ou le promoteur des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV.

Par ailleurs, la cassette d'expression comporte avantageusement une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit synthétisé, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Enfin, la cassette d'expression comprend généralement une région située en 3', qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation.

Les facteurs trophiques utilisables dans le cadre de l'invention se classent essentiellement dans la famille des neurotrophines, la famille des neurokines, la famille du TGF bêta, la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) et des facteurs de croissance de type insuline (IGFs) (revue 16).

Plus préférentiellement, dans la famille des neurotrophines, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention le BDNF, le NT-3 ou le NT-4/5.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), décrit par Thoenen (17), est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue 18). La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et séquencée (19), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (20). Bien que ses propriétés soient potentiellement

intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF

5 humain ou un BDNF animal.

La neurotrophine 3 (NT3) est une protéine sécrétée de 119 aa qui permet la survie in vitro de neurones même à des concentrations très faibles (21). La séquence du cDNA codant pour la NT3 humaine a été décrite (22).

La famille du TGF-B comprend notamment le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales. Le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales, GDNF (23) est une protéine de 134 acides aminés et de poids moléculaire de 16 kD. Il a la capacité essentielle de promouvoir in vitro la survie des neurones dopaminergiques et des motoneurones (16). Le facteur neurotrophique dérivé des cellules Gliales (GDNF) produit dans le cadre de

10 la présente invention peut être le GDNF humain ou un GDNF animal. Les séquences d'ADNc codant pour le GDNF humain et le GDNF du rat ont été clonées et séquencées (23).

15

Un autre facteur neurotrophique utilisable dans le cadre de la présente invention est notamment le CNTF ("Ciliary NeuroTrophic Factor"). Le CNTF

20 est une neurokine susceptible d'empêcher la mort des neurones. Comme indiqué précédemment, des essais cliniques ont été interrompus prématurément faute de résultats. L'invention permet maintenant la production prolongée et continue in vivo de CNTF, seul ou en combinaison avec d'autres facteurs trophiques. Le cDNA et le gène du CNTF humain et

25 murin ont été clonés et séquencés (EP385 060; WO91/04316).

D'autres facteurs neurotrophiques utilisables dans le cadre de la présente invention sont par exemple l'IGF-1 (Lewis et al., 1993) et les Facteurs de Croissance des Fibroblastes (FGFa, FGFB). En particulier, l'IGF-I et le FGFa sont des candidats très intéressants. La séquence du gène du FGFa a été

décrite dans la littérature, ainsi que des vecteurs permettant son expression in vivo (WO95/25803).

Préférentiellement, le système d'expression de l'invention permet donc la production in vivo d'un facteur neurotrophique choisi parmi les neurotrophines, les neurokines et les TGF. Il s'agit plus préférentiellement d'un facteur choisi parmi le BDNF, le GDNF, le CNTF, la NT3, le FGFa et l'IGF-I. D'un intérêt tout particulier est la production de NT3.

Par ailleurs, selon une variante de l'invention, il est également possible de mettre en oeuvre un système d'expression permettant la production de deux facteurs neurotrophiques. Dans ce mode de réalisation, le système d'expression comporte soit deux cassettes d'expression, soit une seule cassette permettant l'expression simultanée de deux acides nucléiques (unité bicistronique). Lorsque le système comprend deux cassette d'expression, celles-ci peuvent utiliser des promoteurs identiques ou différents.

Dans les systèmes d'expression de l'invention, la ou les cassettes d'expression font avantageusement partie d'un vecteur. Il peut s'agir en particulier d'un vecteur viral ou plasmidique. Dans le cas d'un système d'expression comportant plusieurs cassettes d'expression, les cassettes peuvent être portées par des vecteurs séparés, ou par le même vecteur.

Le vecteur utilisé peut être un vecteur plasmidique standard, comportant, en plus de la ou des cassettes d'expression selon l'invention, une origine de réplication et un gène marqueur. Différents types de vecteurs améliorés ont par ailleurs été décrits, dépourvus de gène marqueur et d'origine de réplication (WO96/26270) ou possédant par exemple une origine de réplication conditionnelle (PCT/FR96/01414). Ces vecteurs sont utilisables avantageusement dans le cadre de la présente invention.

Le vecteur utilisé peut également être un vecteur viral. Différents vecteurs ont été construits à partir de virus, ayant des propriétés de transfert de gènes

remarquables. On peut citer plus particulièrement les adénovirus, les rétrovirus, les AAV et le virus de l'herpès. Pour leur utilisation comme vecteurs de transfert de gènes, le génome de ces virus est modifié de manière à les rendre incapable de réplication autonome dans une cellule.

- 5 Ces virus sont dits défectifs pour la réplication. Généralement, le génome est modifié par substitution des régions essentielles en trans à la réplication virale par la ou les cassettes d'expression.

Dans le cadre de l'invention, on préfère utiliser un vecteur viral dérivé des adénovirus. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une
10 taille de 36 (kilobases) kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont
15 nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été
20 séquencées.

Pour leur utilisation comme vecteurs de transfert de gènes, différentes constructions dérivées des adénovirus ont été préparées, incorporant différents gènes thérapeutiques. Plus particulièrement, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1,
25 essentielle à la réplication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle
30 thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver

la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (13). D'autres vecteurs comprennent une deletion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des

5 ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits pas exemple dans les demandes

10 WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378. En outre, des vecteurs portant une modification au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Les adénovirus recombinants décrits dans la littérature sont produits à partir de différents sérotypes d'adénovirus. Il existe en effet différents sérotypes

15 d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C, en particulier les

20 adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans

25 la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation, c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs des fonctions déficientes dans le génome adénoviral recombinant. L'une de ces lignées est par exemple la lignée 293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est également capable de produire, à température permissive (32°C), des stocks de virus comportant en outre la mutation E2 thermosensible. D'autres lignées cellulaires capables de compléter la région E1 ont été décrites, basées notamment sur des cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites. En particulier, on peut citer des lignées complétant les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559 ; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322 ; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complétant les régions E1 et E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071). Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Après la lyse des cellules, les particules virales recombinantes sont isolées par centrifugation en gradient de chlorure de césium. Des méthodes alternatives ont été décrites dans la demande FR96 08164 incorporée à la présente par référence.

- La cassette d'expression du ou des gènes thérapeutiques peut être insérée en différents sites du génome de l'adénovirus recombinant, selon les techniques décrites dans l'art antérieur. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Elle peut également être insérée au niveau de la
- 5 région E3, en addition ou en substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 délétée. Pour la construction de vecteurs portant deux cassettes d'expression, l'une peut être insérée au niveau de la région E1, l'autre au niveau de la région E3 ou E4. Les deux cassettes peuvent également être introduites au niveau de la même région.
- 10 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, la composition comprenant le système d'expression peut être formulée de différentes façons. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches,
- 15 notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple des protéines stabilisatrices (sérum-albumine humaine notamment : FR96 03074), du poloxamère ou encore un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir
- 20 de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Par ailleurs, lorsque le système d'expression est composé de vecteurs plasmidiques, il peut être
- 25 avantageux d'ajouter dans la composition un ou plusieurs agents chimiques ou biochimiques favorisant le transfert de gènes. A cet égard on peut citer plus particulièrement les polymères cationiques de type polylysine, (LK $\overline{\text{L}}$ K)n, (LK $\overline{\text{K}}$ L)n tels que décrits dans la demande WO95/21931, polyéthylène imine (WO96/02655) et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou
- 30 lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir

son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, tels que décrits dans la demande WO95/18863 ou WO96/17823) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire (WO96/25508), éventuellement fonctionnalisés pour cibler certains tissus. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

De manière particulièrement préférée, le système d'expression utilisé dans l'invention est constitué par un adénovirus recombinant défectif codant pour un facteur neurotrophique. Encore plus particulièrement, le facteur neurotrophique est la NT3. Pour leur utilisation dans l'invention, les adénovirus sont avantageusement formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature. Les exemples ci-après montrent de manière tout à fait remarquable que des doses de 10^9 et 10^7 permettent (i) un transfert efficace de gènes dans les neurones sectionnés, (ii) une expression durable du transgène dans lesdits neurones et (iii) une restitution de la continuité axonale.

L'introduction du système d'expression dans le manchon peut être réalisée de différentes manières, et en particulier au moyen de seringues. L'injection au moyen de microseringues est préférée (microseringue Hamilton ou Terumo).

Une des applications particulièrement intéressantes de la présente invention est la stimulation de la repousse des nerfs périphériques. Ce traitement peut

être appliqué dans différentes situations pathologiques, notamment des traumatismes ou des dégénérescences nerveuses. Il peut être appliqué à tout nerf accessible chirurgicalement, et en particulier aux nerfs radial, cubital, médian, colatéraux des doigts et inter-osseux, pour les membres
5 supérieurs, et aux nerfs sciatique (diamètre d'environ 1 cm à sa naissance) ou crural (diamètre 6-7 mm), pour les membres inférieurs.

Une autre application particulièrement avantageuse de l'invention est la restitution d'une continuité nerveuse au niveau des racines du plexus brachial (diamètre 5-6 mm) ou au sein même de la moelle épinière,
10 consécutivement à un traumatisme. Ce type de lésion ne connaît pas aujourd'hui de traitement. La méthode de l'invention permet de réaliser un pontage entre la section sous-jacente à une section de la moelle et la section sus-jacente de celle-ci, de manière à joindre les principaux faisceaux et à régénérer une continuité nerveuse. Pour ces applications, les manchons
15 utilisés ont de préférence un diamètre interne pouvant atteindre 15 à 20 mm. En particulier, pour le pontage d'une racine avulsée au niveau du plexus brachial, le diamètre du manchon correspond au diamètre de la racine.

La présente invention a donc également pour objet un produit pour la libération locale et prolongée d'une substance neurotrophique au niveau
20 d'une lésion nerveuse composé d'un manchon biocompatible permettant de joindre les parties sus- et sous-lésionnelles, dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.

La présente invention peut être utilisée pour stimuler la régénération nerveuse in vivo aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Elle peut en
25 outre être utilisée, chez l'animal, pour étudier les propriétés d'un nouveau facteur trophique (nouvelle protéine, mutant, etc). Pour cela, un animal est soumis à une section nerveuse, puis un système d'expression du facteur à tester est introduit dans un dispositif selon l'invention. La capacité dudit facteur à restaurer une continuité nerveuse est déterminée comme indiqué

dans les exemples. Ce dispositif permet en outre de comparer différents facteurs, ou d'étudier des association synergiques de différents facteurs.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 Légende des Figures

Figure 1 : Description de la mise en place, sur un nerf périphérique, d'un dispositif selon l'invention.

Figure 2 : Microphotographie prise au niveau de la portion sacro-lombaire de la moelle épinière et montrant une forte production de β -galactosidase (révélée par le substrat X-Gal) au sein des motoneurones spinaux.

Figure 3 : Aspect macroscopique de la repousse tissulaire à J12. (A) Exemple observé chez un animal témoin. Aucune continuité tissulaire n'est observée entre les extrémités proximale et distale de la réparation nerveuse. (B) Aspect du contenu du tuteur chez un animal ayant reçu une injection de 10^7 pfu Ad-NT3. Il est possible de noter la présence d'un cable tissulaire joignant les extrémités proximale et distale de la réparation nerveuse.

Figure 4 : Aspects de marquages rétrogrades par la HRP observés à J12. (A) Dans le groupe témoin, quelques rares motoneurones faiblement marqués sont observés. (B) Dans le groupe traité par 10^7 pfu Ad-NT3, un grand nombre de neurones spinaux fortement marqués sont présents.

Figure 5 : Description de la mise en place selon l'invention d'un pontage des afférences périphériques sous-jacentes à une lésion au niveau de la moelle saine sus-jacente à ladite lésion.

Figure 6 : Description de la mise en place, dans la moelle épinière, d'un dispositif selon l'invention.

Figure 7 : Description de la réponse motrice observée en fonction du temps après l'intervention sur le nerf et la mise en place du dispositif selon l'invention.

1. Méthodologie

1-1. Vecteurs adénoviraux:

Comme indiqué précédemment, les vecteurs viraux, et notamment les adénovirus, constituent un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention.

Les adénovirus recombinants utilisés ont été obtenus par recombinaison homologue selon les techniques décrites dans l'art antérieur. En bref, il sont construits dans les cellules 293, par recombinaison entre un fragment de génome viral linéarisé (dl324) et un plasmide contenant l'ITR gauche, les séquences d'encapsulation, le transgène ainsi que son promoteur et des séquences virales permettant la recombinaison. Les virus sont amplifiés sur cellules 293. Il sont régulièrement repurifiés dans le P3 de notre laboratoire. Les génomes viraux peuvent également être préparés dans une cellule procaryote selon la technique décrite dans la demande WO96/25506. Les virus suivants sont plus particulièrement utilisés:

- Ad- β Gal : Adénovirus recombinant défectif dérivé d'un sérotype Ad5 comprenant (i) une délétion de la région E1 au niveau de laquelle est introduite une cassette d'expression comportant un acide nucléique codant pour la β -galactosidase de E.coli sous contrôle du promoteur du LTR du virus du sarcome de rous (désigné LTR-RSV ou RSV), et (ii) une délétion de la région E3. La construction de cet adénovirus a été décrite dans Stratford-Perricaudet et al. (J.Clin.Invest. 90 (1992) 626).

- Ad-NT3 : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 déléetée, une cassette d'expression du NT3 composée du cDNA codant pour le NT3 sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.

- 5 - Ad-CNTF : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 délétée, une cassette d'expression du CNTF composée du cDNA codant pour le CNTF sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Les détails de la construction sont données dans la demande WO94/08026. Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.
- 10 - Ad-GDNF : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 délétée, une cassette d'expression du GDNF composée du cDNA codant pour le GDNF sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Les détails de la construction sont données dans la demande WO95/26408). Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.
- 15 - Ad-BDNF : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 délétée, une cassette d'expression du BDNF composée du cDNA codant pour le BDNF sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Les détails de la construction sont données dans la demande WO95/25804).
- 20 Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.
- 25 - Ad-FGFa : Adénovirus recombinant de sérotype Ad5 comprenant, inséré dans son génome à la place de la région E1 délétée, une cassette d'expression du FGFa composée du cDNA codant pour le FGFa sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel (en particulier le LTR du RSV). Les détails de la construction sont données dans la demande WO95/25803). Une construction alternative comprend une délétion supplémentaire dans la région E4, telle que décrite dans la demande WO96/22378.
- 30 La fonctionnalité des virus construits est vérifiée par infection de fibroblastes en culture. La présence du facteur neurotrophique correspondant est

analysée dans le surnageant de culture par ELISA et/ou en mettant en évidence les propriétés trophiques de ce surnageant sur des cultures primaires neuronales.

- 5 Il est entendu que d'autres constructions dérivées des adénovirus peuvent être réalisées et utilisées dans le cadre de l'invention, et en particulier des vecteurs portant des délétions supplémentaires et/ou des promoteurs différents et/ou codant pour d'autres facteurs neurotrophiques.

1-2. Protocole chirurgical

- 10 Les animaux étaient constitués par des rats mâles Sprague-Dawley de 320-340 g (Iffa Credo - Les Oncins - France). Sous anesthésie générale (injection intra-péritonéale de Pentobarbital 1 ml/kg - Sanofi Santé Animale), la peau de la patte postérieure droite est incisée au niveau de la cuisse, et les plans musculaires sont écartés de manière à exposer le nerf sciatique droit. Le nerf est sectionné à mi-distance entre le creux poplité et la séparation du nerf
- 15 sciatique, et un segment de 5 mm est oté (Fig. 1B). Une prothèse tubulaire en silicone (14 mm de long, 1.47 mm de diamètre interne, épaisseur de la paroi: 0.23 mm - Silastic, Dow Corning Corporation, USA) est présentée. L'extrémité proximale du nerf est introduite dans le tube et est maintenue en place à l'aide d'une suture 9/0 en nylon reliant l'épinèvre et le nerf. Une
- 20 seconde suture entre le tube et le nerf au niveau distal est mise en place de manière à obtenir une perte de substance de 10 mm (distance limite pour laquelle une régénération nerveuse périphérique spontanée peut être observée chez le rat dans les conditions expérimentales utilisées) (Fig. 1C). L'étanchéité du montage au niveau proximal est alors réalisée à l'aide d'une
- 25 colle de fibrine (Tissucol, Immuno AG, Vienne, Autriche), avant que 10 µl de la solution virale, ou de soluté salin isotonique pour les animaux témoins, ne soit introduite dans le tuteur, en contact avec l'extrémité proximale du nerf, à l'aide d'une microseringue (Fig. 1D). Le volume mort du tuteur est rempli par une solution saline isotonique (solution de Chlorure de Sodium à 0.9%),

avant que l'extrémité distale du nerf ne soit introduite à son tour dans la prothèse tubulaire, et l'étanchéité de cette extrémité assurée par la colle de fibrine (Fig.1E). Les plans musculaires et cutanés sont refermés à l'aide d'une suture standard en nylon 6/0 et 4/0 respectivement. Les animaux sont
5 replacés dans une cage individuelle, et maintenus en cycle jour/nuit 12h/12h.

1-3. Contrôle de la repousse axonale et marquage rétrograde des motoneurones spinaux par la Horseradish Peroxydase (HRP).

Douze jours plus tard, et après anesthésie générale des animaux, le montage est réexposé et disséqué des adhérences l'environnant. La
10 présence d'une continuité tissulaire est notée avant que le montage ne soit sectionné à 3 mm en aval de l'extrémité proximale de la section nerveuse d'origine. Le "moignon" ainsi obtenu est rincé avec du soluté salin isotonique, avant d'être empli avec une solution de HRP à 30% (w/v)(Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). Après 1 heure d'incubation, cette solution est
15 ôtée, et l'extrémité nerveuse rincée avec une solution saline isotonique avant que les plans musculaires et cutanés ne soient refermés et les animaux replacés dans leurs cages. Quarante huit heures plus tard, les animaux sont réanesthésiés, et fixés, après rinçage en PBS, par perfusion intracardiaque de glutaraldéhyde à 3.6%. Les moelles épinières sont alors disséquées,
20 post-fixées pendant 3 heures en glutaraldéhyde 3.6%, et placées en sucrose 30%(w/v) pendant 48 heures à 72 heures. Les parties lombo-sacrées des moelles sont coupées en congélation en coupes longitudinales séries de 35 μ m d'épaisseur, et la présence de HRP révélée suivant la technique classique décrite par Mesulam(15), et utilisant la 3,3',5,5'-Tetramethyl-
25 Benzidine.

1-4. Détection de la β -Galactosidase

L'activité β -Galactosidase a été visualisée par utilisation du substrat X-Gal(14). Brièvement, des sections longitudinales de la moelle sacro-lombaire de 100 μ m d'épaisseur sont incubées pendant 18 h. à 37°C en PBS

contenant de l'hexacyanoferrate de potassium (4 mM), du ferricyanide de potassium (4 mM), du substrat X-Gal (0.4 mg/ml), et du chlorure de magnésium (4 mM). Après incubation, les coupes tissulaires sont rincées en PBS, puis montées en milieu aqueux (Gélatine-Glycérol).

5 **2. Mise en évidence du transport rétrograde des adénovirus non-replicatifs par les motoneurones spinaux axotomisés, et vérification de l'expression du transgène.**

Cette première étude a permis de mettre en évidence que des neurones axotomisés pouvaient effectuer un transport rétrograde de vecteurs adénoviraux et exprimer un transgène sur des temps pouvant atteindre 4
10 semaines. Le vecteur (Adénovirus β -Galactosidase décrit en 1-1.) a été injecté à raison de 10^9 pfu par tube, et l'expression de son transgène testée à J4, J14, 4 semaines.

A 4 jours, une forte expression de β -galactosidase était observée au niveau
15 de la corne ventrale de la portion sacro-lombaire de la moelle épinière correspondant aux racines innervant le nerf sciatique (Fig.2). Cette forte expression du transgène par les motoneurones spinaux était retrouvée à 14 jours avec au total un nombre moyen de cellules β -galactosidase positive de 63.2 ± 33.6 cell., soit une efficacité d'infection de l'ordre de 12.25% du nombre
20 total de neurones spinaux innervant le nerf sciatique. La présence d'une activité β -galactosidase dans la région sacro-lombaire de la moelle épinière a été détectée jusqu'à 4 semaines avec une intensité de marquage décroissante (Tableau I).

25 **3. Test de l'effet d'un vecteur codant pour une neurotrophine (NT3) sur la repousse axonale du nerf sciatique de rat au travers d'une perte de substance de 10 mm.**

Suite à ces résultats montrant la possibilité d'utiliser un système de type thérapie génique in vivo pour stimuler la repousse nerveuse après axotomie,

- Suite à ces résultats montrant la possibilité d'utiliser un système de type thérapie génique in vivo pour stimuler la repousse nerveuse après axotomie, nous avons testé l'effet d'un adénovirus portant un transgène codant pour la neurotrophine 3 (Ad-NT3 décrit en 1-1.) sur la régénération nerveuse
- 5 périphérique. Les résultats obtenus 12 jours après réalisation de l'axotomie et réparation du nerf avec un tuteur guide en Silastic ayant reçu 10^7 pfu de vecteur, ou une solution saline isotonique montrent qu'une continuité tissulaire n'est observée que dans le groupe d'animaux traités par un Ad-NT3 (Fig.3, Tableau II). L'analyse par marquage rétrograde par la HRP du
- 10 nombre de motoneurons spinaux ayant régénéré un axone au travers du tuteur guide, indique que cette continuité tissulaire est constituée par une repousse nerveuse, avec une moyenne de 182.3 ± 76.5 neurones HRP positif contre 24.25 ± 42.7 neurones HRP positifs dans le groupe témoin (Fig.4, Tableau II).
- 15 Ces résultats permettent de conclure qu'un dispositif selon l'invention utilisant des vecteurs adénoviraux replication déficient portant des gènes codant pour des facteurs neurotrophiques peut être utilisé pour promouvoir une repousse axonale aussi bien centrale que périphérique.

4. Comparaison de la reprise fonctionnelle après section d'un nerf

20 périphérique chez le rat

- Une lésion a été pratiquée au niveau du nerf sciatique chez le rat adulte afin de créer une perte de substance d'au moins 10 mm. Les parties proximales et distales de la lésion ont été jointes au moyen d'un dispositif selon l'invention (tube en silicone, 14 mm de longueur, 1.47 mm de diamètre interne
- 25 - Silastic) dans lequel a été introduit soit une solution saline, soit AV-RSV β gal (10^7 pfu dans 10 μ l), soit AV-RSVNT₃ (10^7 pfu dans 10 μ l), ou encore la protéine NT3. La reprise fonctionnelle a été mesurée par électromyographie: la réponse motrice dans le muscle gastrocnémien a été enregistrée toutes les deux semaines (Fig 7).

Une reprise fonctionnelle a été observée dans le groupe traité avec l' AV-RSVNT₃, comparée aux autres groupes. Cette augmentation a été statistiquement significative par comparaison dans le temps avec le groupe AV-RSVβgal au delà du jour 112, et du jour 70 au jour 112 avec le groupe rNT3. Une analyse électromyographique des profils individuels montrent que le traitement avec AV-RSVNT₃ augmente la probabilité pour un animal donné d'initier la repousse du nerf. Cependant, le taux de repousse n'est pas modifié lorsque la repousse a débuté.

Ces résultats suggèrent donc que le transfert de gène codant pour un facteur neurotrophique au moyen de la technique décrite dans la présente invention est efficace pour augmenter la reprise fonctionnelle après section d'un nerf périphérique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Archibald et al.- J. Comp. Neurol. 1991, 306, 685-696.
- 2- Lundborg et al.- J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1982, 41, 412-422.
- 3- Lundborg et al.- Exp. Neurol. 1982, 76, 361-375.
- 5 4- Seckel et al.- Plast. Reconstr. Surg. 1986, 78, 793-798.
- 5- Lundborg et al.- Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 1991, 25, 79-82.
- 6- Lundborg et al.- J. Hand Surg. 1994, 19, 273-276.
- 7- Cordeiro et al.- Plast. Reconstr. Surg. 1989, 13, 183-198.
- 10 8- Aebischer et al.- J. Neurosci. Res. 1989, 23, 282-289.
- 9- Laquerriere et al.- Microsurg. 1994, 15, 203-210.
- 10- Derby et al.- Exp. Neurol. 1993, 119, 176-191.
- 11- Sahenk et al.- Brain Res. 1994, 655, 246-250.
- 12- Glazner et al.- Neurosci. 1993, 54, 791-797.
- 15 13- Van der Vliet et al., 1975
- 14- Finiels et al.- Neuroreport, 1995, 7, 373-378.
- 15- Mesulam - J. Histochem. Cytochem. 1978, 26, 106-117.
- 16- Henderson, Adv. Neurol. 68 (1995) 235
- 17- Thoenen (Trends in NeuroSci. 14 (1991) 165
- 20 18- Lindsay in Neurotrophic Factors, Ed, (1993) 257, Academic Press
- 19- Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558
- 20- Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149
- 21- Henderson et al, Nature 363,266-270 (1993)
- 22- Hohn et al., Nature 344 (1990) 339
- 25 23- L.-F. Lin et al., Science, 260, 1130-1132 (1993)

TABLEAU I: Détermination de l'efficacité d'infection des motoneurones axotomisés par un vecteur adénoviral codant pour la β -Galactosidase

5

Délai	Animaux	Nombre de neurones fortement marqués	Nombre de corps cellulaires marqués	Nombre total de neurones marqués
J4	1	10	12	22
	2	36	55	91
	3	17	31	48
J14	1	16	24	40
	2	59	48	107
	3	24	6	30
4 semaine				Marquages diffus

TABLEAU II: Effet de l'injection d'un Ad-NT3 sur la repousse axonale à J12

5

Groupe	Animal	Délai	Continuité tissulaire	Nombre de neurones HRP positifs
Témoin	T01	J12	+	0
	T02	J12	-	9
	T03	J12	-	88
	T05	J13	-	0
Ad-NT3 10 ⁷ pfu	N71	J12	+++	182
	N72	J12	+++	106
	N73	J12	+++	N.D.*
	N75	J14	+++	259

N.D.: Non déterminé

10 * Animal décédé en cours de perfusion.

REVENDEICATIONS

1. Dispositif pour la stimulation de la régénération nerveuse comprenant un manchon biocompatible dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.
- 5 2. Kit pour la stimulation de la régénération nerveuse comprenant d'une part un manchon biocompatible et d'autre part une composition comprenant un système d'expression d'un facteur neurotrophique.
3. Utilisation, pour la préparation d'une composition destinée à stimuler la régénération nerveuse, d'un manchon biocompatible dans lequel est introduit
10 un système d'expression d'un facteur neurotrophique.
4. Utilisation selon la revendication 3 pour la préparation d'une composition destinée à stimuler la régénération des nerfs périphériques.
5. Utilisation selon la revendication 3 pour la préparation d'une composition destinée à stimuler la régénération axonale dans la moelle épinière.
- 15 6. Utilisation, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des lésions traumatiques du système nerveux, d'un manchon biocompatible dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.
- 20 7. Produit pour la libération locale et prolongée d'une substance neurotrophique au niveau d'une lésion nerveuse composé d'un manchon biocompatible permettant de joindre les parties sus- et sous-lésionnelles, dans lequel est introduit un système d'expression d'un facteur neurotrophique.
- 25 8. Utilisation selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisée en ce que le manchon est constitué d'un support tubulaire en matériaux non-toxique et biocompatible.

9. Utilisation selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisée en ce que la première section du nerf est introduite dans une extrémité du manchon où elle est maintenue en place par suture et/ou colle, le système d'expression est introduit dans le manchon, puis la deuxième section du nerf est insérée
- 5 dans la deuxième extrémité du manchon où elle est maintenue par suture et/ou colle.
10. Utilisation selon l'une des revendications 3 à 6 caractérisée en ce que le système d'expression est constitué d'un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour ledit facteur neurotrophique.
- 10 11. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur viral.
12. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce que le vecteur viral est un vecteur adénoviral.
- 15 13. Utilisation selon la revendication 10 caractérisée en ce que le facteur neurotrophique est choisi parmi les facteurs de la famille des neurotrophines, des neurokines, du TGF bêta, des FGFs et des IGFs.
14. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que le facteur neurotrophique est choisi parmi le BDNF, le GDNF, le CNTF, la NT3, le FGFa et l'IGF-I.

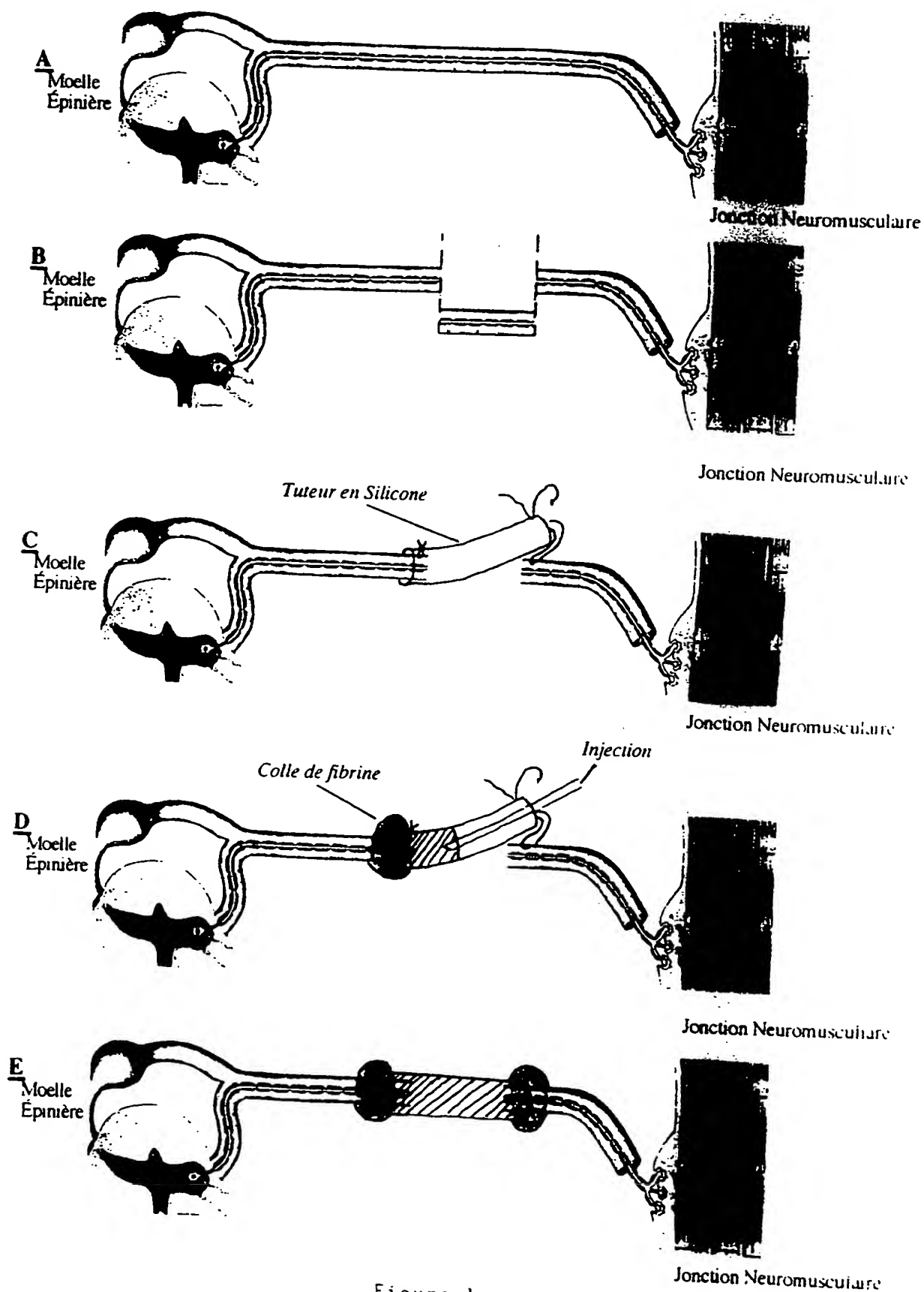


Figure 1

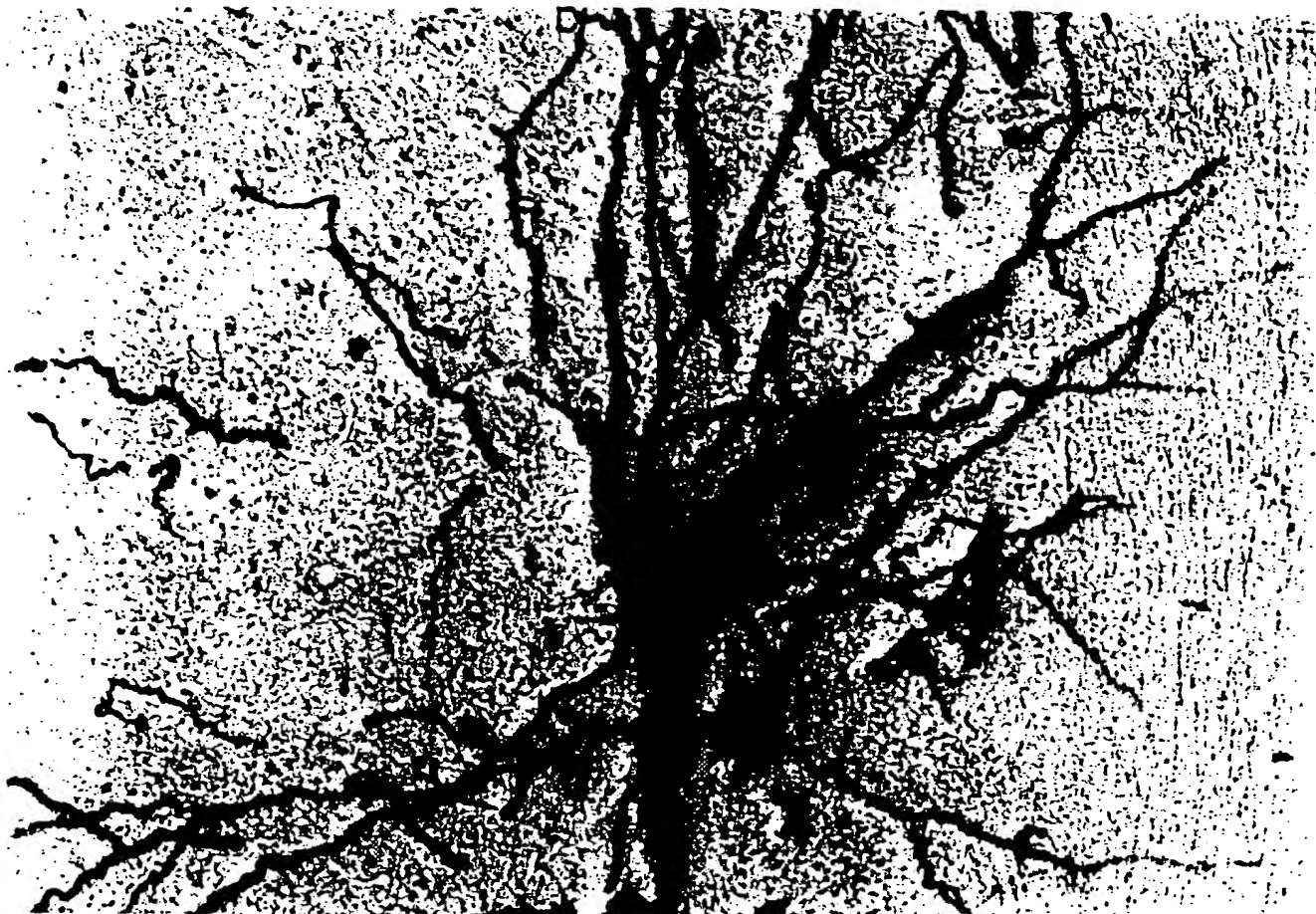


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

A



Figure 3A

B



Figure 3B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

A

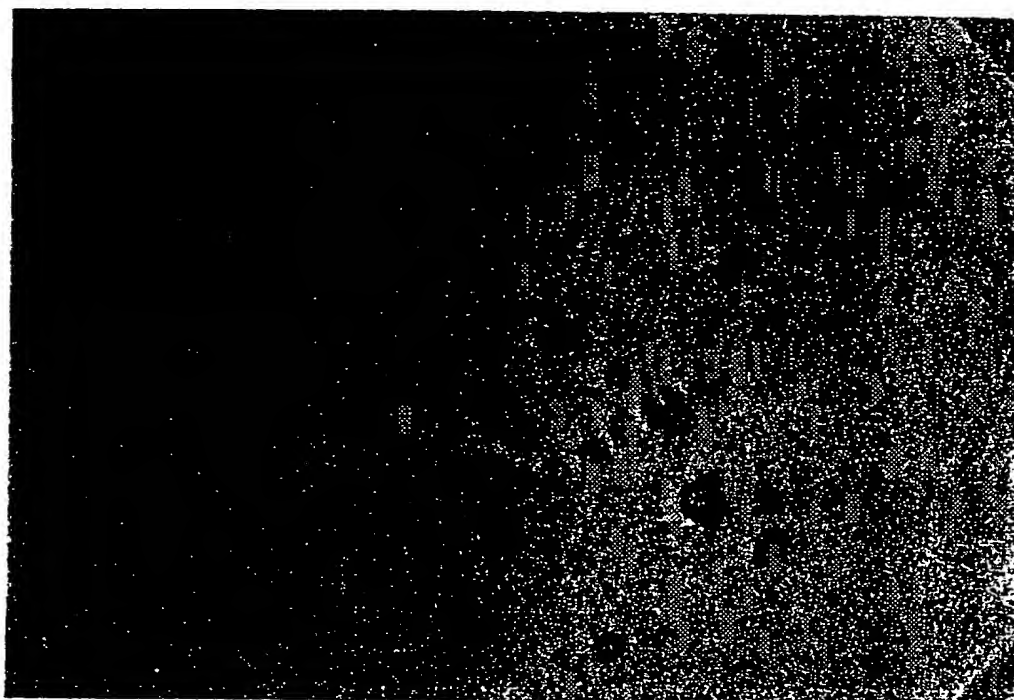


Figure 4A

B



Figure 4B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

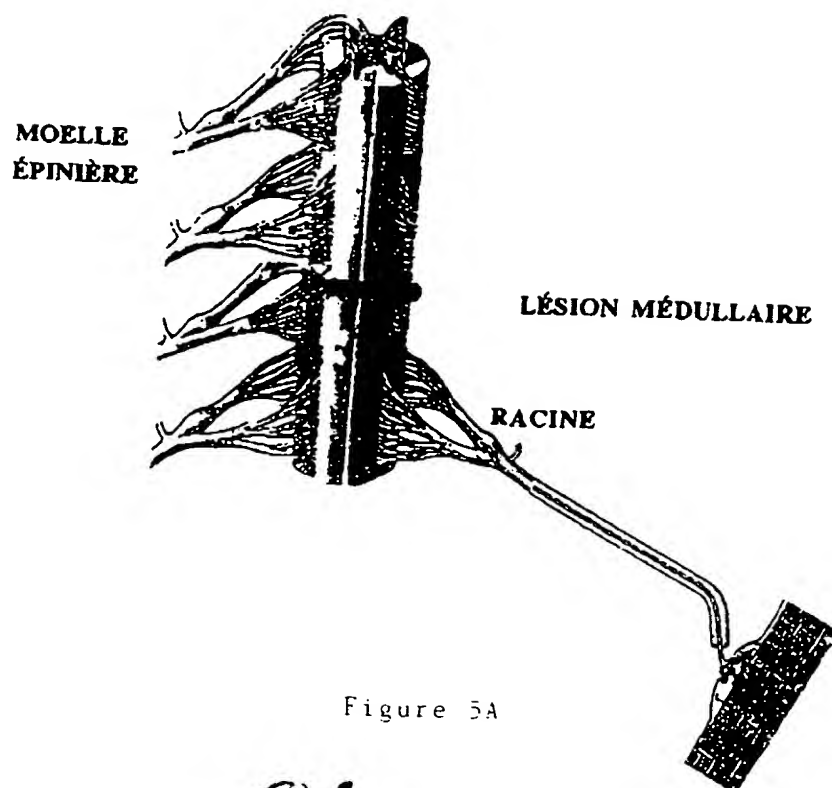


Figure 5A

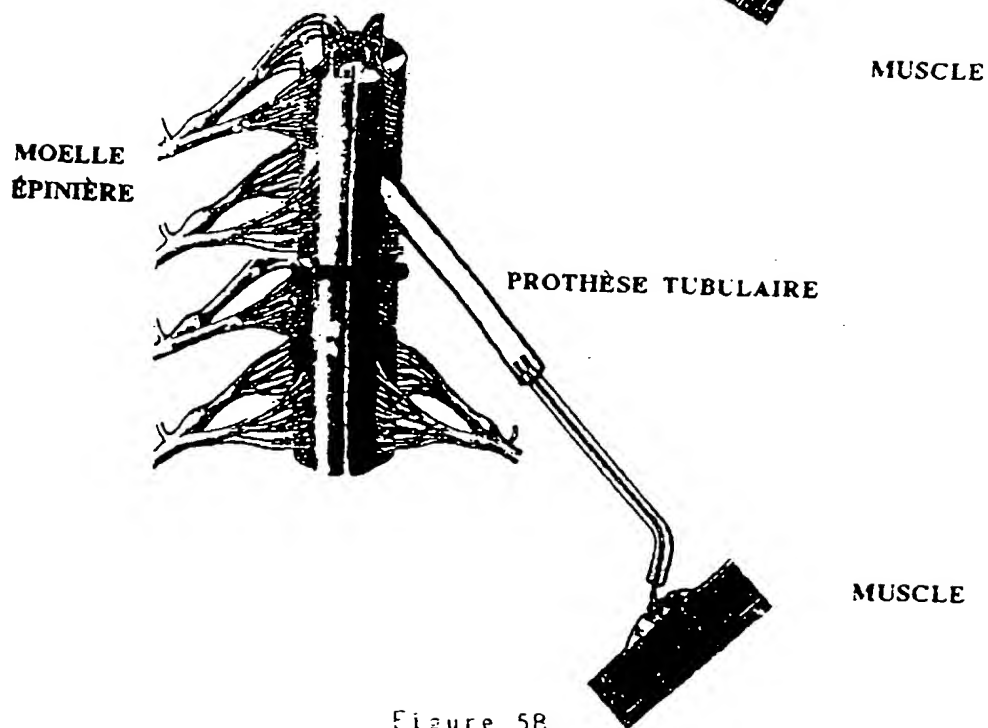


Figure 5B

6/7

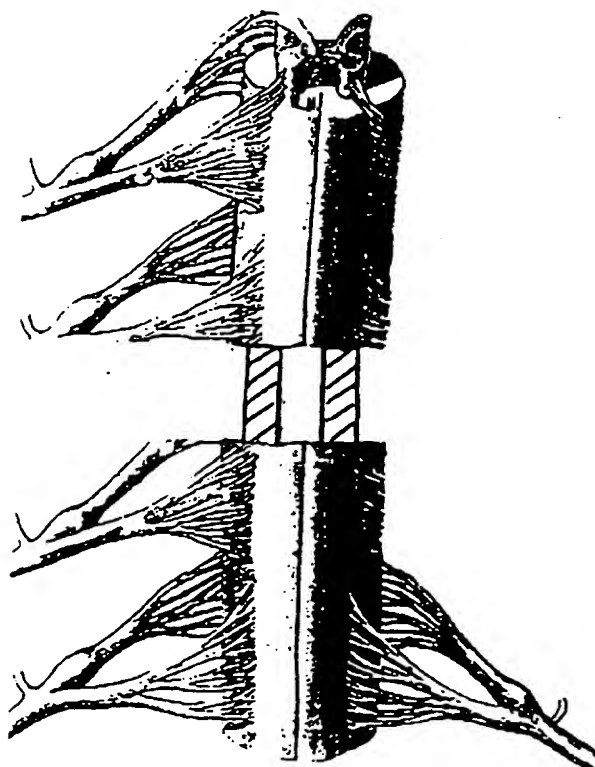
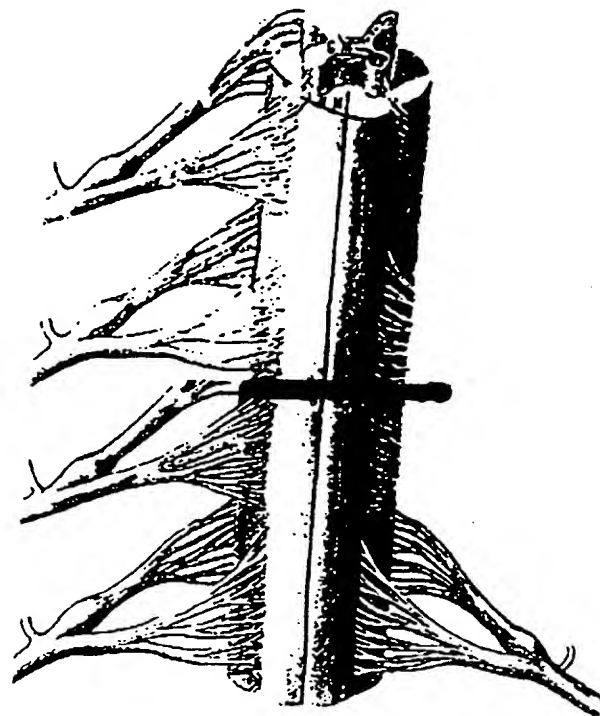


Figure 6

7/7

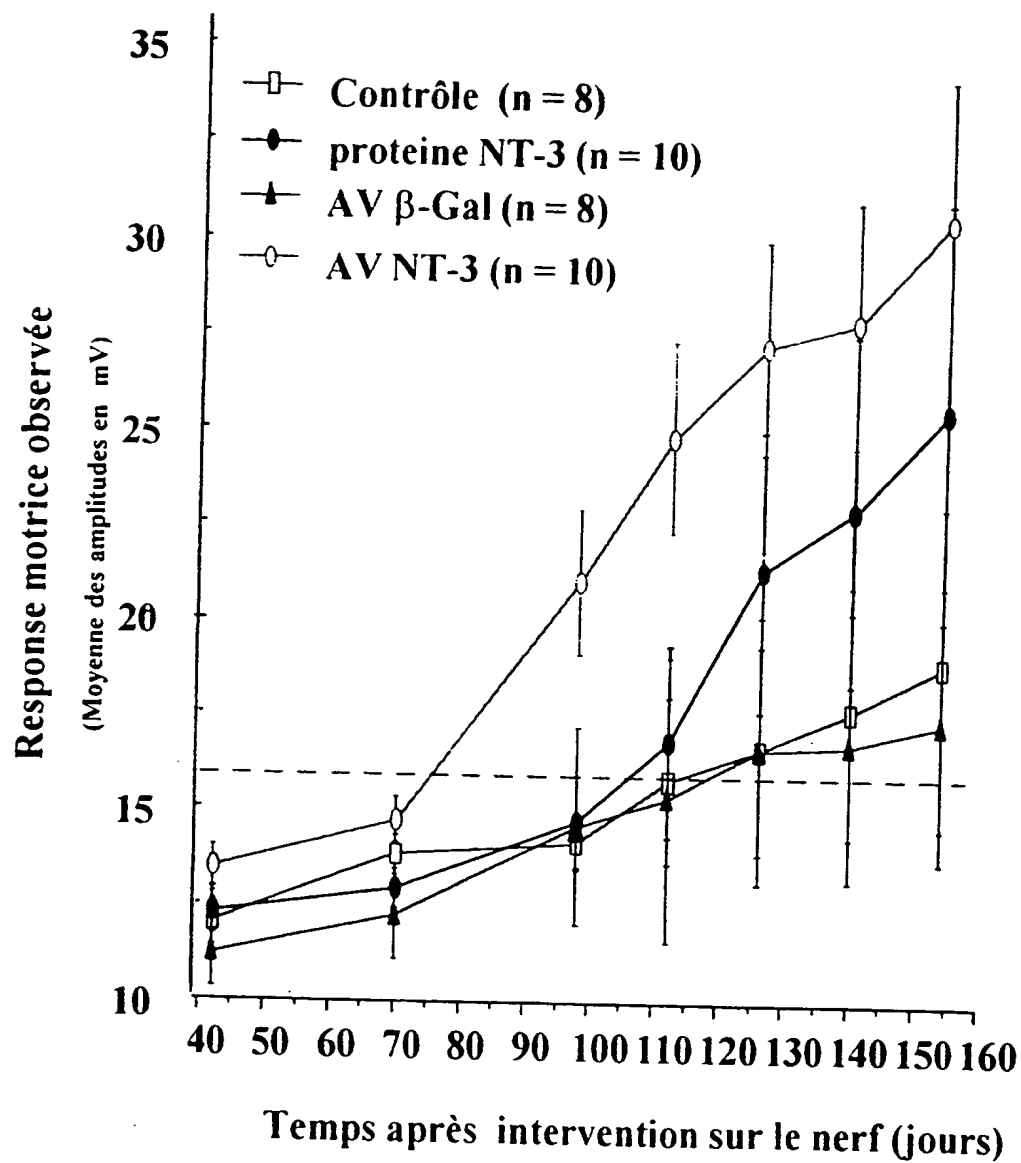


Figure 7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No

PCT/FR 98/00595

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61L31/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 03212 A (FIDIA SPA ; DORIGATTI FRANCO (IT); FAVARO GIORGIO (IT); CALLEGARO L) 17 février 1994 voir page 32, ligne 34 - page 33, ligne 26 voir revendications ---	1-14
A	US 5 202 120 A (SILVER JERRY ET AL) 13 avril 1993 voir colonne 4, ligne 49 - ligne 68 voir colonne 14, ligne 16 - ligne 40 voir revendications ---	1-14
A	FR 2 727 867 A (RHONE POULENC RORER SA) 14 juin 1996 -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

*** Catégories spéciales de documents cités.**

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 juillet 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/07/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cousins-Van Steen, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 98/00595

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9403212 A	17-02-1994	IT 1259141 B	11-03-1996
		AU 690891 B	07-05-1998
		AU 4706493 A	03-03-1994
		CA 2140888 A	17-02-1994
		EP 0652778 A	17-05-1995
		JP 7509386 T	19-10-1995
US 5202120 A	13-04-1993	US 4900553 A	13-02-1990
		AU 6918891 A	31-05-1991
		WO 9106631 A	16-05-1991
		AU 2529388 A	17-04-1989
		EP 0332692 A	20-09-1989
		JP 2501535 T	31-05-1990
FR 2727867 A	14-06-1996	WO 8902459 A	23-03-1989
		AU 4350296 A	03-07-1996
		CA 2208224 A	20-06-1996
		CZ 9701806 A	17-09-1997
		EP 0797677 A	01-10-1997
		FI 972491 A	12-06-1997
		WO 9618740 A	20-06-1996
		HU 77258 A	02-03-1998
		NO 972712 A	12-06-1997
		SK 74597 A	10-12-1997